

DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.007

· 基础研究 ·

Ad. RGD-ING4-PTEN 对神经胶质瘤 U87 细胞增殖、凋亡及侵袭的影响

韩亚丽¹,王家融²,杨吉成²,盛伟华²,缪竞诚²(1. 上海交通大学医学院附属上海儿童医学中心 血液肿瘤科,上海 200127; 2. 苏州大学医学部 细胞与分子生物学教研室,江苏 苏州 215123)

[摘要] **目的:** 探讨经 RGD 修饰的生长抑制因子 4 (inhibitor of growth 4, *ING4*) 基因与第 10 染色体缺失与张力蛋白同源的磷酸酶基因 (phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, *PTEN*) 双基因共表达的腺病毒载体 (Ad. RGD-ING4-PTEN) 体外对神经胶质瘤 U87 细胞的增殖、凋亡及侵袭的影响。**方法:** 以 Ad. RGD-ING4-PTEN 为实验组, Ad. RGD-ING4/-PTEN 为单基因对照组, PBS、Ad. RGD/Ad-GFP 为空白对照组, 分别体外感染 U87 神经胶质瘤细胞。Western blotting 检测目的基因 *ING4* 和 *PTEN* 在 U87 细胞中的表达, MTT 法检测实验组病毒感染对 U87 细胞增殖的影响, 流式细胞术及 Real-time PCR 法检测神经胶质瘤细胞凋亡及凋亡相关基因 (*Bcl-2*, *Bax*, *caspase-3*, *HIF-1 α*) 表达变化, 划痕实验及 Transwell 实验检测实验组病毒感染对 U87 细胞迁移及侵袭能力的影响, Real-time PCR 法检测侵袭相关基因 (*MMP-2*, *MMP-9*) 表达变化。**结果:** 成功检测到 *ING4* 和 *PTEN* 仅在实验组及相应单基因对照组中表达。实验组第 5 天细胞抑制率可达 (83.1 ± 4.6)%、凋亡率可达 (40.7 ± 4.3)% , 与单基因组及空白对照组相比差异均有统计学意义 ($P < 0.05$); 实验组能明显上调 U87 细胞中 *Bax*, *caspase-3* 和下调 *HIF-1 α* 、*Bcl-2* 等细胞凋亡相关蛋白的表达 (均 $P < 0.05$), 而且肿瘤侵袭相关分子 *MMP-2*、*MMP-9* 的表达也明显下调 (均 $P < 0.05$); 实验组细胞迁移距离 [(70.1 ± 6.2) μm] 和穿膜细胞数 [(26.6 ± 3.5) 个] 均明显减少, 与单基因组及空白对照组比较差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。**结论:** 与单基因腺病毒相比, Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因具有更显著的抑制 U87 神经胶质瘤细胞增殖、诱导其凋亡, 并抑制其迁移及侵袭能力。

[关键词] 神经胶质瘤; 生长抑制因子基因 4; 第 10 染色体缺失与张力蛋白同源的磷酸酶基因; 基因治疗

[中图分类号] R739.41; R730.54 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1007-385X(2016)03-0335-08

Influence of Ad. RGD-ING4-PTEN on proliferation, apoptosis and invasion of neuroglioma U87 cell

HAN Yali¹, WANG Jiarong², YANG Jicheng², SHENG Weihua², MIAO Jingcheng²(1. Pediatric Hematology and Oncology, Shanghai Children's Medical Center Affiliated to School of Medicine, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200127, China; 2. Cell and Molecular Biology Institute, College of Medicine, Soochow University, Suzhou 215123, Jiangsu, China)

[Abstract] **Objective:** To explore effect of the adenovirus vector (Ad. RGD-ING4-PTEN) modified with RGD and co-expressing with double genes coding inhibitor of growth 4 (*ING4*) and phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (*PTEN*) on proliferation, apoptosis and invasion of human neuroglioma cells *in vitro*. **Methods:** Neuroglioma U87 cells were *in vitro* infected with Ad. RGD-ING4-PTEN as experimental group, Ad. RGD-ING4/-PTEN as monogenge control group and PBS, Ad. RGD/RGD-GPF as blank control group. Expressions of the target genes, *ING4* and *PTEN* in the U87 cells were detected by Western blotting. Effect of infection with the Ad. RGD-ING4-PTEN of experimental group on proliferation of the U87 cell was detected by MTT assay. Changes in apoptosis of the neuroglioma cells and expressions of apoptosis-related genes, *Bcl-2*, *Bax*, *caspase-3* and *HIF-1 α* , were respectively examined with flow cytometry and Real-time PCR assays. Effects of infection with the Ad. RGD-ING4-PTEN of experimental group on migration and invasion abilities were detected with scratch and Transwell assays respectively. Expression of invasion-associated genes, *MMP-2* and *MMP-9*, was de-

[基金项目] 国家自然科学基金青年基金资助项目 (No. 81001016)。Project supported by the National Natural Science Foundation for Young Scholars of China (No. 81001016)

[作者简介] 韩亚丽 (1983 -), 女, 湖北省襄阳市人, 硕士, 住院医师, 主要从事血液肿瘤学研究, E-mail: hanyali321@sina.com

[通信作者] 缪竞诚 (MIAO Jingcheng, corresponding author), E-mail: jemiao@suda.edu.cn

[优先发表] <http://www.cnki.net/kcms/detail/31.1725.R.20160527.1612.004.html>

tected by Real-time PCR. **Results:** Expressions of *ING4* and *PTEN* were successfully detected only in the experimental group and the corresponding monogene control groups. Inhibitory and apoptosis rate of the U87 cell on 5th day in experimental group were $(83.1 \pm 4.6)\%$ and $(40.7 \pm 4.3)\%$, respectively, compared to the blank control and monogene control groups, the differences were statistically significant ($P < 0.05$). In the experimental group, expressions of apoptosis-related proteins, Bax and caspase-3, were remarkably up-regulated, while expressions of HIF-1 α and Bcl-2 proteins down-regulated in the U87 cells (all $P < 0.05$), and expressions of invasion-associated molecules *MMP-2* and *MMP-9* also down-regulated significantly (all $P < 0.05$). Migration distances ($[70.1 \pm 6.2] \mu\text{m}$) of the cells and number of the penetrated cells ($[26.6 \pm 3.5]$ cell) in the experiment group were significantly lesser than those in the monogene control and blank control groups (all $P < 0.05$). **Conclusion:** The adenovirus with double-gene *ING4* and *PTEN* (Ad. RGD-*ING4*-*PTEN*) could more significantly inhibit proliferation and induce apoptosis of the neuroglioma U87 cells, compared to those in the adenovirus with monogene, and also could inhibit migration and invasion abilities of the U87 cells.

[**Key words**] neuroglioma; human glioma cells; inhibitor of growth 4 (*ING4*); phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten (*PTEN*); gene therapy

[Chin J Cancer Biother, 2016, 23(3): 335-342. DOI:10.3872/j.issn.1007-385X.2016.03.007]

神经胶质瘤是人类发病率最高的原发性中枢神经系统恶性肿瘤,约占颅脑肿瘤的46%^[1];中位生存时间约为1年,5年生存率不足5%^[2]。该病确切的发病机制尚不清楚,其发展过程是多步骤多因素所致^[3]。现阶段主要治疗手段是手术治疗,术后辅以放疗和化疗,但总体疗效不理想。近年来,随着分子生物学和基因工程技术的发展,基因治疗已倍受关注,为神经胶质瘤提供了新的治疗策略。*ING4*是生长抑制因子(inhibitor of growth, ING)家族中的一个成员,研究^[4-7]表明*ING4*基因在多种肿瘤中易发生缺失突变和/或表达下调,与肿瘤发生和恶性程度密切相关。第10染色体缺失与张力蛋白同源的磷酸酶基因(phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, *PTEN*)是一种具有双特异磷酸酶活性的抑癌基因,抑制肿瘤细胞生长、迁移等,同时*PTEN*是通过一定的信号通路抑制肿瘤细胞生长、促进肿瘤细胞凋亡^[8-11]。目前关于RGD-4C修饰的*ING4*和*PTEN*双基因共表达重组腺病毒表达载体基因治疗神经胶质瘤的研究报道尚属空白。本课题在Ad. RGD-*ING4*-*PTEN*双基因共表达重组腺病毒成功构建的基础上,选择人神经胶质瘤细胞系U87作为实验对象,研究Ad. RGD-*ING4*-*PTEN*对神经胶质瘤细胞的体外细胞毒作用,诱导神经胶质瘤细胞凋亡的效应及其潜在的分子机制。

1 材料与方法

1.1 重组腺病毒和主要试剂

Ad-GFP、Ad. RGD-GFP、Ad. RGD-*ING4*、Ad. RGD-*PTEN*、Ad. RGD-*ING4*-*PTEN*重组腺病毒均为本实验室之前构建及保存。MTT试剂购自美国Sigma公司,

24孔Transwell小室、6孔细胞培养板、96孔细胞培养板购自美国Corning公司,荧光定量试剂盒SsoFast EvaGreen Supermix购自美国Bio-Rad公司,细胞凋亡Annexin-V-PE/7-AAD双染试剂盒购自南京凯基公司,引物合成购自上海生工生物技术有限公司,*ING4*抗体购自美国Santa Cruz公司,*PTEN*抗体购自美国Cell Signaling公司, β -actin抗体购自上海碧云天生物技术有限公司,Page Ruler Prestained Protein Ladder购自美国Fermentas公司,Dylight 800-Labeled Antibody荧光二抗购自美国KPL公司。

1.2 Western blotting法检测外源性*ING4*和*PTEN*基因的表达

实验分为6组(下文所有实验均按此分组):空白对照组(PBS组、Ad-GFP空载体组、Ad. RGD-GFP空载体组)、单基因对照组(Ad. RGD-*ING4*及Ad. RGD-*PTEN*单基因组)和实验组(Ad. RGD-*ING4*-*PTEN*组)。将携带不同基因的腺病毒以50 MOI的感染剂量感染U87细胞(细胞数约为 4×10^6 个),实验分组同前。感染48 h后收集细胞, PBS洗涤,加细胞裂解液收集总蛋白, SDS-PAGE分离, 2 h将蛋白转移至PVDF膜上,用5%脱脂奶粉37℃脱色摇床上封闭1 h;分别用小鼠抗人*ING4*(1:1 000)和小鼠抗人*PTEN*抗体(1:1 000)在4℃孵育过夜, TBST洗涤3次;再分别加Dylight-800标记的荧光二抗, 37℃避光作用1 h, TBST避光洗涤3次,每次5 min;最后在荧光成像仪上进行拍照。

1.3 MTT法检测Ad. RGD-*ING4*或/和*PTEN*单、双基因表达对U87细胞生长的影响

将对数生长期的U87细胞,按 5×10^3 个/孔接种于96孔板, 37℃、5% CO₂培养24 h后,将实验

分组的腺病毒以 50 MOI 的剂量分别感染 96 孔板中细胞,每组设 5 个复孔,37 °C、5% CO₂ 条件下孵育。随后分别于 1,2,3,4,5 d 加 MTT (5 mg/ml) 10 μl/孔,继续孵育 4~6 h 后加入溶解剂 [10% SDS + 1% HCl (1 mol/L)] 100 μl/孔,至次日待甲臞结晶完全溶解后,在酶联免疫检测仪上测 D₅₇₀ 值,并按抑制率 (%) = (PBS 组 D₅₇₀ 值 - 实验组 D₅₇₀ 值) / PBS 组 D₅₇₀ 值 × 100% 计算细胞生长抑制率。

1.4 流式细胞术检测 *ING4* 和 *PTEN* 基因的表达对 U87 细胞凋亡的影响

采用 PE-AnnexinV/7-AAD 双荧光标记,FCM 检测细胞凋亡的变化。具体方法如下:按实验分组的腺病毒感染细胞后 37 °C、5% CO₂ 培养 48 h,收集细胞制成单细胞悬液,加入 100 μl 的结合缓冲液悬浮细胞后加入 1 μl Annexin V-PE 混匀,37 °C 避光水浴 15 min,然后加入 5 μl 7-AAD 染液混匀,37 °C 避光水浴 10 min,然后加入 400 μl 的结合缓冲液,1 h 内进行流式细胞术检测。

1.5 Real-time PCR 法检测细胞凋亡调控相关基因的转录情况

按实验分组的腺病毒感染 U87 人神经胶质瘤细胞 48 h 后收集细胞并提取总 RNA,逆转录得 cDNA 后,按反转录试剂盒步骤,并以 Bax: sense 5'-ACACCTGAGCTGACCTTGGGA-3', antisense 5'-CCGTGTCCACGT-CAGCAATC-3'; Bcl-2: sense 5'-CATGTGTGTGGAGAGCGTCAA-3', antisense 5'-GCCGGTTCAGTACTCAGT-CA-3'; caspase-3: sense 5'-AGAGCTGGACTGCGGTATTGAG-3', antisense 5'-GAACCATGACCCGTCCTTG-3' 和 HIF-1α: 5'-ctcctaccacatacataaaga-3', antisense 5'-gact-caaagcgacagataaac -3' 为引物,进行 Real-time PCR,分别检测 *Bax*、*Bcl-2*、*caspase-3* 和 *HIF-1α* 基因在各组 U87 细胞中 mRNA 的转录。按照公式: $\Delta Ct = Cq(\text{目的基因}) - Cq(\text{GAPDH})$, 目的基因初始含量 = $2^{-\Delta Ct}$, 计算其在各组细胞中的转录含量。

1.6 体外划痕实验检测细胞迁移能力

将 U87 细胞株于对数生长期接种于 6 孔板中培养,待细胞基本长满后将实验分组的腺病毒分别感染 U87 细胞。用无菌 200 μl 枪头于细胞层中横向划线,形成宽度均匀一致的划痕,造成培养细胞伤口模型,此时倒置显微镜下观察拍照,测定宽度,作为划痕后 0 时。24 h 后测定划痕的宽度,每条划痕取 3 个测量点,计算 3 点的均值作为实验的初始划痕宽度值。用 Image-pro Plus 软件分别测量处理前和处理后细胞划痕边界的距离,处理前的距离减去处理后后距离即为 24 h 的细胞迁移距离,计算并用统计软件分析。

1.7 *ING4* 或/和 *PTEN* 单、双基因表达对 U87 细胞侵袭能力的影响

1.7.1 Transwell 侵袭实验 将冻存于 -80 °C 冰箱的 BD Matrigel 4 °C 过夜,变成液态;取 300 μl 无血清培养基,加入 60 μl Matrigel 冰浴混匀,加入上室 100 μl;放入 37 °C 培养箱中,孵育 5 h,直至出现“白色层”变为固态;按实验分组的腺病毒分别感染 U87 细胞。24 h 后收集各组细胞用含 BSA 的无血清培养基重悬,调整细胞密度至 5×10^5 /ml;用无血清培养基洗 Matrigel 一次;每孔加入 100 μl 细胞悬液;下腔室中加入 500 μl 含有 20% FBS 条件培养基,37 °C 培养箱中,孵育 24 h。取出 Transwell 小室用 PBS 洗 2 遍,5% 戊二醛固定;用棉球擦去上表面细胞,加入 0.1% 结晶紫染色 10 min,室温 0.5 h, PBS 洗 2 遍,显微镜下观察并拍照。

1.7.2 Real-time PCR 检测 *MMP-2*、*MMP-9* 基因的转录情况 按试剂盒说明书操作,以 *MMP-2*: sense 5'-GCTATGGACCTTGGGAGAA-3', antisense 5'-TG-GAAGCGGAATGGAAAC-3'; *MMP-9*: sense 5'-TC-CCTGGAGACCTGAGAACC-3', antisense 5'-CGGCA-AGTCTTCCGACTAGTTT-3' 为引物,进行 Real-time PCR,分别检测 *MMP-2*、*MMP-9* 基因在各组 U87 细胞中 mRNA 的转录。

1.8 统计学处理

采用 SPSS16.0 统计软件分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间数据比较采用方差分析。以 $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 *ING4*、*PTEN* 基因在 U87 细胞中的表达

Western blotting 检测结果(图 1)显示,双基因实验组病毒感染 U87 组可产生与抗人 *ING4* 抗体和抗人 *PTEN* 抗体特异性结合的条带;Ad-*ING4* 单基因组只产生与抗人 *ING4* 抗体特异性结合的条带;Ad-*PTEN* 单基因组只产生与抗人 *PTEN* 抗体特异性结合的条带;Ad-GFP、Ad. RGD-GFP 空病毒感染组和 PBS 细胞对照组均未出现上述条带。此结果进一步表明重组腺病毒介导的外源性 *ING4* 和 *PTEN* 基因在 U87 细胞中成功表达目的蛋白。

2.2 各重组腺病毒对 U87 细胞增殖的影响

按实验分组的腺病毒感染 U87 人神经胶质瘤细胞,MTT 检测 1~5 d 的细胞生长活力,并计算其第 5 天对 U87 细胞生长抑制率。由图 2 可见,与空白对照组 Ad. RGD-GFP 组 (24.3 ± 1.2)% 和 Ad-GFP 组 (1.8 ± 0.7)% 比较,Ad. RGD-*ING4*-*PTEN* 双基因组与 Ad.

RGD-ING4/PTEN 单基因组呈现明显生长抑制作用(均 $P < 0.05$);而双基因实验组与单基因对照组相比,其对 U87 细胞的抑制作用更为显著[$(83.1 \pm 4.6)\%$ vs $(66.5 \pm 3.5)\%$ 、 $(63.0 \pm 2.7)\%$, $P = 0.029, 0.031$]。与 Ad-GFP 空载体比较,Ad. RGD-GFP 空载体腺病毒对 U87 细胞也有一定的生长抑制作用($P = 0.023$)。

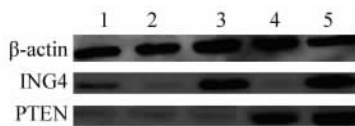


图1 U87 细胞中 ING4 和 PTEN 蛋白表达

Fig. 1 Expressions of ING4 and PTEN protein in U87 cells

1: PBS;2: Ad-GFP;3:Ad. RGD-GFP;4: Ad. RGD-ING4;
5: Ad. RGD-PTEN; 6: Ad. RGD-ING4-PTEN

2.3 各重组腺病毒对 U87 细胞凋亡及凋亡相关基因表达的影响

Annexin-V-PE/7-AAD 双染色标记后 FCM 检测结果(图3)显示,Ad. RGD-GFP 组、Ad-GFP 组和 PBS 组凋亡率仅 $(5.1 \pm 1.1)\%$ 、 $(4.6 \pm 0.9)\%$ 和 $(1.6 \pm 0.3)\%$, Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因组和 Ad. RGD-ING4/-PTEN 单基因组与之相比,U87 细胞凋亡率显著升高(均 $P < 0.05$);并且双基因实验组比单基因组诱导 U87 细胞凋亡的作用更为明显[$(40.7 \pm 4.3)\%$ vs $(28.9 \pm 1.6)\%$ 、 $(27.6 \pm 3.2)\%$, $P = 0.031, 0.037$]。

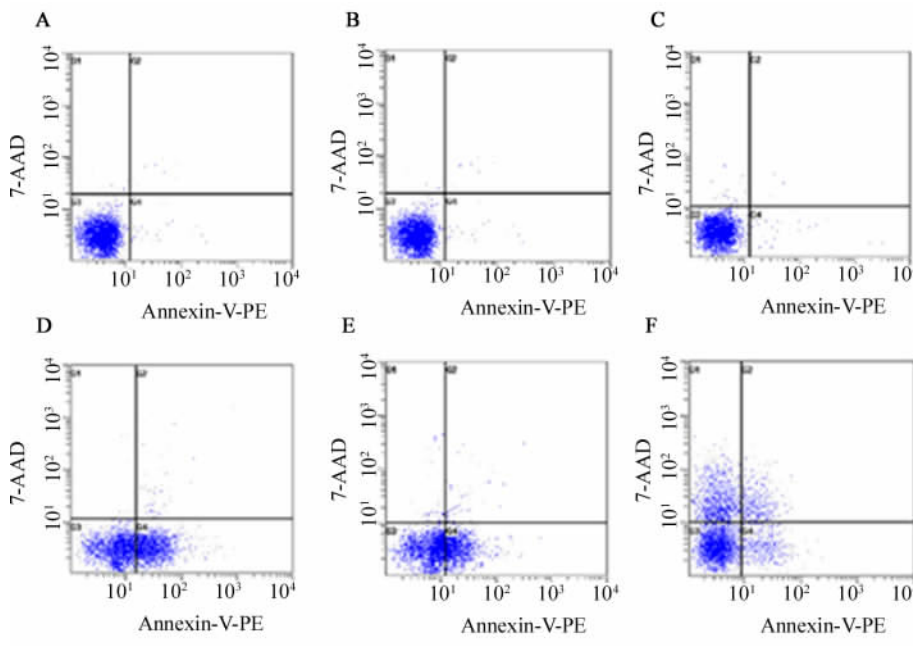


图3 各重组腺病毒诱导 U87 细胞凋亡的流式细胞术检测

Fig.3 U87 cells apoptosis detected by flow cytometry

A: PBS;B: Ad. GFP;C: Ad. RGD-GFP;D: Ad. RGD-ING4;E: Ad. RGD-PTEN;F: Ad. RGD-ING4-PTEN

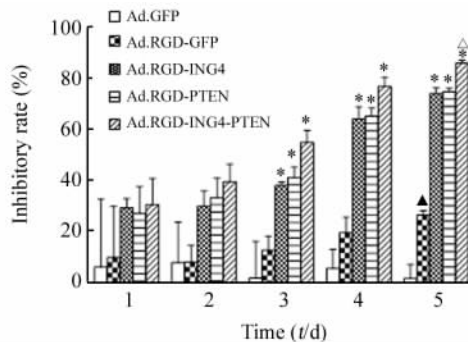


图2 各组腺病毒对 U87 细胞增殖的影响

Fig. 2 Growth inhibiting effects on U87 cells after adenovirus infection

* $P < 0.05$ vs Ad-GFP or Ad. RGD-GFP;
△ $P < 0.05$ vs Ad. RGD-ING4 or Ad. RGD-PTEN;
▲ $P < 0.05$ vs Ad. GFP

由 Real-time PCR 结果(图4)可见,单基因组及双基因实验组 *Bax*、*caspase-3* 基因相对转录水平明显上升,*Bcl-2*、*HIF-1α* 基因相对转录水平明显下降(均 $P < 0.05$);并且双基因实验组较单基因组调节水平变化更为明显(均 $P < 0.05$)。结果表明,Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因重组腺病毒可能通过诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤血管生长等途径抑制 U87 神经胶质瘤细胞的生长。

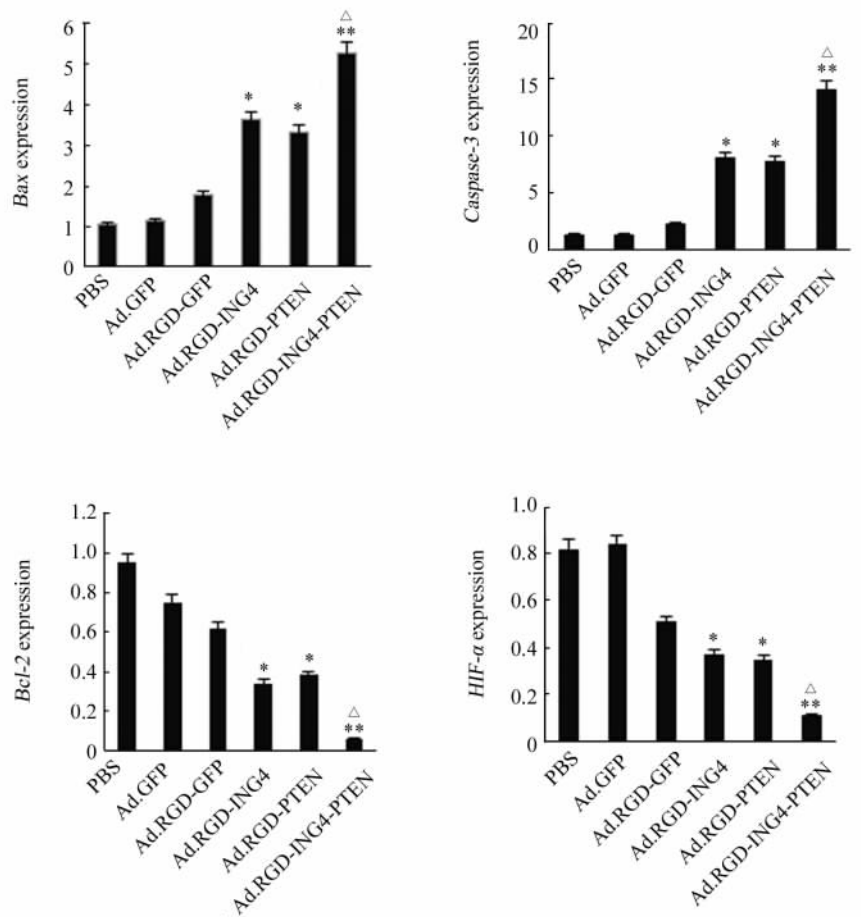


图 4 荧光定量 PCR 检测 U87 细胞 *Bax*、*caspase-3* 和 *Bcl-2*、*HIF-1α* 基因转录水平

Fig. 4 mRNA expressions of *Bax*, *Caspase 3* and *Bcl-2*, *HIF-1α* in U87 cells by fluorescent quantitative PCR

* $P < 0.05$ vs PBS or Ad. GFP or Ad. RGD-GFP; [△] $P < 0.05$ vs Ad. RGD-ING4 or Ad. RGD-PTEN group

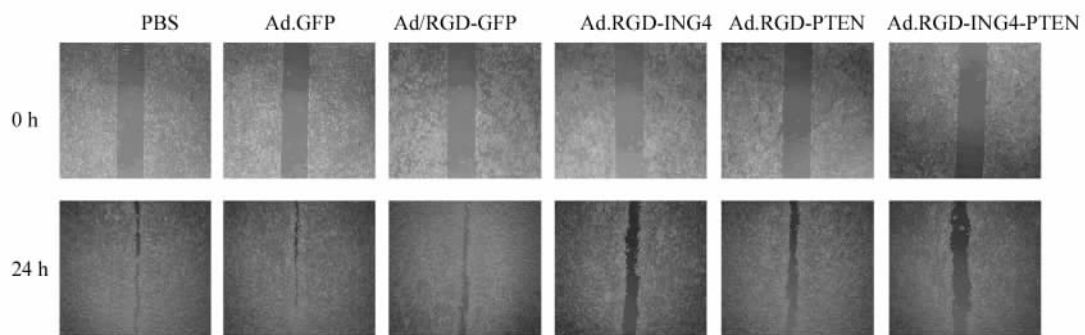


图 5 划痕实验检测细胞迁移能力变化

Fig. 5 Effect of adenovirus on migration of U87 cells

2.4 各重组腺病毒对 U87 细胞迁移的影响

采用体外划痕法比较腺病毒感染对 U87 迁移能力的影响, 见图 5。PBS 组、Ad-GFP 和 Ad. RGD-GFP 组细胞随着时间的延长, 划痕的宽度由于细胞

迁移而逐渐变窄, 并逐渐融合, 细胞迁移距离分别为 (458.6 ± 20.3) 、 (391.3 ± 13.2) 、 (355.7 ± 14.2) μm , Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因组和 Ad. RGD-ING4/-PTEN 单基因组与对照组相比, 迁移距离明

显下降(均 $P < 0.05$)。而双基因实验组与单基因组相比, U87 细胞的迁移能力下降更为显著[$(70.1 \pm 6.2) vs (102.4 \pm 10.2), (131.3 \pm 9.7) \mu m, P = 0.019, 0.028$], 表明 U87 细胞经 Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因重组腺病毒感染后迁移能力明显降低。

2.5 各重组腺病毒对 U87 细胞侵袭能力的影响

Transwell 小室法检测结果(图 6)显示, Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因病毒组和 Ad. RGD-ING4/PTEN 单基因病毒组穿膜细胞数比 Ad. RGD-GFP 组[(73.1 ± 4.2) 个], Ad-GFP 组[(85.6 ± 5.9) 个]和 PBS 组[(92.6 ± 6.3) 个]明显减少(均 $P < 0.05$); 双基因实验组穿膜细胞数较单基因组减少更为显著

[$(26.6 \pm 3.5) vs (45.2 \pm 4.6), (47.8 \pm 4.1)$ 个, $P = 0.014, 0.023$]。

荧光定量 PCR 法检测各组重组腺病毒感染 U87 细胞后肿瘤侵袭相关基因 *MMP-2*、*MMP-9* mRNA 的含量, 由图 7 可见, 双基因实验组及单基因组病毒感染后, U87 细胞 *MMP-2* 和 *MMP-9* 的表达均明显下调, 与 Ad. RGD-GFP 组、Ad-GFP 组和 PBS 组相比较具有统计学意义(均 $P < 0.05$)。且双基因组比与单基因组下调能力更为显著($P = 0.025, 0.039$)。以上结果提示, Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因组病毒可能通过下调 *MMP-2* 和 *MMP-9* 的表达而抑制细胞侵袭, 且该作用较单基因组更强。

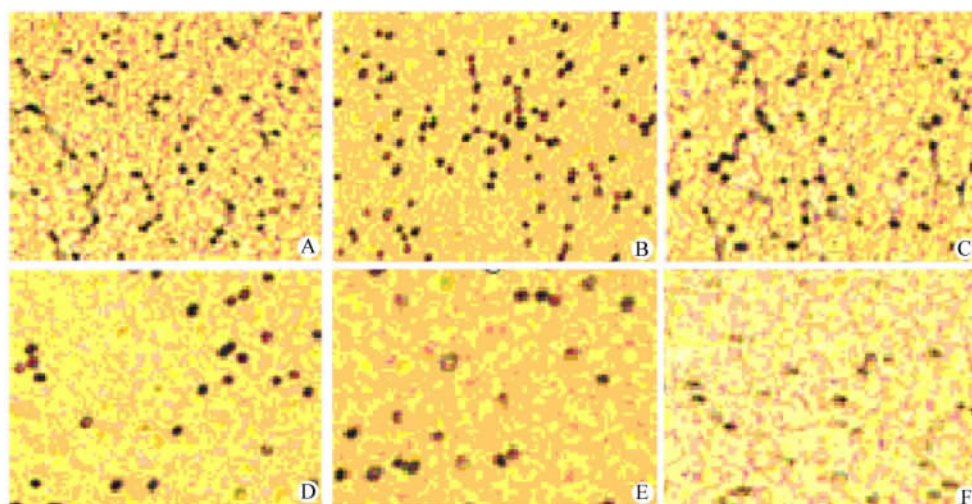


图 6 Transwell 法检测 U87 细胞侵袭能力的变化($\times 100$)

Fig. 6 Change of invasion ability of U87 cells by Transwell assays($\times 100$)

A: PBS; B: Ad. GFP; C: Ad. RGD-GFP; D: Ad. RGD-ING4; E: Ad. RGD-PTEN; F: Ad. RGD-ING4-PTEN

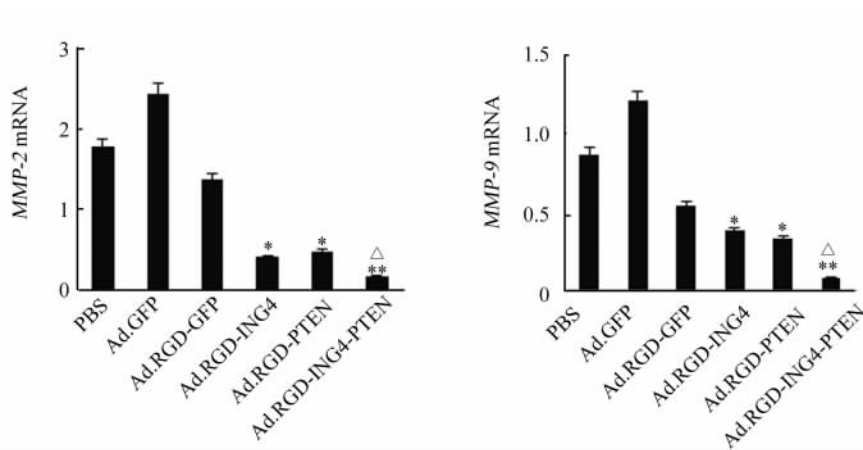


图 7 Real-time PCR 检测各组 U87 细胞 *MMP-2* 和 *MMP-9* mRNA 的表达

Fig. 7 Analysis of mRNA expression of *MMP-2*, *MMP-9* in U87 cells by Real-time PCR

* $P < 0.05 vs$ PBS or Ad. GFP or Ad. RGD-GFP; $\Delta P < 0.05 vs$ Ad. RGD-ING4 or Ad. RGD-PTEN group

3 讨论

腺病毒载体是目前基因治疗研究中应用较为广泛的基因载体之一。腺病毒作为肿瘤基因治疗的载体有许多优点,但应用的最大局限性是如何提高目的基因的感染效率并降低其自身的细胞毒作用。有学者^[12]通过分子生物学的手段对腺病毒进行改造,将 RGD-4C 编码序列(TGCCACTGTAGAGGAGACT-GCTTTTGT)插入到骨架质粒 pAdeasy-1 上(在核酸序列 32 679 和 32 680 之间),改造后的骨架质粒命名为 pAd. RGD。改造后的 pAd. RGD 衣壳蛋白表面表达 RGD-4C,以特异性地引导载体直接与肿瘤细胞黏附,提高腺病毒的感染效率。通过基因克隆技术,融合表达 RGD 序列的腺病毒载体已被用于靶向肿瘤治疗的药物研究,展示出良好的应用前景^[13-16]。

腺病毒与靶细胞的结合主要是通过识别目的细胞膜表面的柯萨奇病毒受体(Coxsackie virus receptors, CAR)。由腺病毒载体介导的人神经胶质瘤的体内基因治疗效果目前尚不理想。有学者^[17]通过免疫组化和荧光扫描活细胞的方法对人的肿瘤样本进行分析后发现,在大多数样本中, CAR 表达量低,而 VEGF 受体和整合素的表达通常高且具有特异性,据此设计出针对整合素的靶向性腺病毒载体(在 HI 环上连接 RGD-4C),结果显示 Ad. RGD 可增加荧光素酶受体基因在神经胶质瘤细胞中的表达,同时明显减少荧光素酶受体基因进入正常脑外移植块中。这表明连接靶向分子在腺病毒纤维节的 HI 环上可提高目的基因的表达效率及对肿瘤细胞的选择性,为临床神经胶质瘤基因治疗提供了可行性。

关于 RGD 修饰的 *ING4* 和 *PTEN* 双基因共表达重组腺病毒表达载体基因治疗神经胶质瘤的研究报道尚属空白。因此,本文在载体成功构建的基础上,进一步研究 Ad. RGD-ING4-PTEN 抑制神经胶质瘤细胞生长和诱导细胞凋亡的效应及其潜在的分子机制。*ING4* 与 *PTEN* 同为抑癌基因,从不同的信号通路进行调控,抑制肿瘤生长,促进肿瘤细胞凋亡。而 RGD 在增加腺病毒载体对肿瘤细胞的黏附力的同时,其竞争性地与肿瘤细胞膜表面的整合素蛋白结合,对肿瘤转移及血管形成能起到抑制作用。

在本研究中,MTT 和流式细胞术检测结果表明,腺病毒介导的 *ING4* 和/或 *PTEN* 单、双基因表达均具有特异性抑制 U87 神经胶质瘤细胞生长的作用;Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因重组腺病毒对 U87

细胞的细胞毒作用和诱导凋亡的作用较 *ING4*、*PTEN* 单基因腺病毒均呈现明显增强作用;Ad. RGD-GFP 与 Ad-GFP 相比,对 U87 细胞也有一定的细胞毒作用和诱导凋亡的作用。

通过荧光定量 PCR 法检测结果表明,与 PBS 组和 Ad-GFP 组相比,Ad. RGD-GFP 组能明显下调 *HIF-1 α* 基因转录水平;*ING4*、*PTEN* 单基因腺病毒组和双基因组均能明显上调 *Bax*、*caspase-3* 基因转录水平,下调 *Bcl-2*、*HIF-1 α* 基因转录水平。既往实验研究提示,*ING4* 与 *PTEN* 能从不同的信号通路进行调控,抑制肿瘤生长、促进肿瘤凋亡^[18-22],本文研究结果与之相符,并且在本实验中双基因组调节能力均强于单基因对照组。结果表明,Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因重组腺病毒能通过联合作用诱导肿瘤细胞凋亡和抑制肿瘤血管生长等途径抑制 U87 神经胶质瘤细胞的生长。

肿瘤细胞体外迁移与侵袭实验结果表明,*ING4*、*PTEN* 单基因腺病毒组和双基因组均能抑制 U87 细胞的迁移与侵袭,并且双基因组腺病毒抑制细胞的迁移作用明显强于单基因组,这可能与其下调 U87 神经胶质瘤细胞肿瘤转移相关因子 *MMP-2* 和 *MMP-9* 的表达相关^[23]。而 Ad. RGD-GFP 对肿瘤的迁移和侵袭的抑制作用较 Ad-GFP 较为明显,这可能与其竞争性结合细胞膜表面的整合素蛋白相关。

综上,Ad. RGD-ING4-PTEN 双基因共表达重组腺病毒载体对 U87 神经胶质瘤细胞具有明显的抑瘤作用,其调控细胞周期、迁移、侵袭和凋亡相关基因表达更为显著的效应可能是重要机制之一,为进一步的体内实验提供了依据。

[参考文献]

- [1] OSTROM Q T, GITTELMAN H, FARAH P, et al. CBTRUS statistical report: primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the United States in 2006-2010 [J]. *Neuro Oncol*, 2013, 15(Suppl 2): ii1-ii56. DOI: 10.1093/neuonc/not151.
- [2] MALMSTROM A, GRONBERG B H, MAROSI C, et al. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: the Nordic randomized, phase 3 trial [J]. *Lancet Oncol*, 2012, 13(9): 916-926. DOI: 10.1016/S1470-2045(12)70265-6.
- [3] COHEN A L, COLMAN H. Glioma biology and molecular markers [J]. *Cancer Treat Res*, 2015, 163: 15-30. DOI: 10.1007/978-3-319-12048-5_2.
- [4] OZER A, WU L C, BURICK R K. The candidate tumor suppressor *ING4* represses activation of the hypoxia inducible factor (HIF) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005, 102(21): 7481-

7486. DOI: 10.1073/pnas.0502716102.

[5] WANG Q S, LI M,ZHANG L Y, et al. Down-regulation of ING4 is associated with initiation and progression of lung cancer [J]. *Histopathology*, 2010, 57(2): 271-281. DOI: 10.1111/j.1365-2559.2010.03623.

[6] TAPIA C, ZLOBEC I, SCHNEIDER S, et al. Deletion of the inhibitor of growth 4(ING4) tumor suppressor gene is prevalent in human epidermal growth factor 2 (HER2)-positive breast cancer [J]. *Hum Pathol*, 2011, 42(7): 983-990. DOI: 10.1016/j.humpath.2010.10.012.

[7] KIM S, WELM A L, BISHOP J M. A dominant mutant allele of the ING4 tumor suppressor found in human cancer cells exacerbates MYC-initiated mouse mammary tumorigenesis [J]. *Cancer Res*, 2010, 70(12): 5155-5162. DOI: 10.1158/0008-5472.can-10-0425.

[8] EMERLING B M, WEINBERG F, LIU J L, et al. PTEN regulates p300-dependent hypoxia-inducible factor 1 transcriptional activity through Forkhead transcription factor 3a(FOXO3a) [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2008, 105(7): 2622-2627. DOI: 10.1073/pnas.0706790105.

[9] SONG M S, SALMENA L, PANDOLFI P P. The functions and regulation of the PTEN tumour suppressor [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2012, 13(5): 283-296. DOI:10.1038/nrm3330.

[10] MOLINARI F, FRATTINI M. Functions and regulation of the PTEN gene in colorectal cancer [J]. *Front Oncol*, 2014, 1(3): 326. DOI:10.3389/fonc.2013.00326.

[11] THUNNISSEN E, VAN DER OORD K, DEN BAKKER M, et al. Prognostic and predictive biomarkers in lung cancer [J]. *Virchows Arch*, 2014, 464(3): 347-358. DOI: 10.1007/s00428-014-1535-4.

[12] LIU Y Z, YE T, SUN D J, et al. Conditionally replication-competent adenoviral vectors with enhanced infectivity for use in gene therapy of melanoma [J]. *Human Gene Therapy*, 2004, 7(15): 637-647. DOI: 10.1089/1043034041361181.

[13] PEI D S, YANG Z X, ZHANG B F, et al. Enhanced apoptosis inducing function of MDA-7/IL-24 RGD mutant via the increased adhesion to tumor cells [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2012, 32(2): 66-73. DOI: 10.1089/jir.2011.0040.

[14] KIM Y H, JEON J, HONG S H, et al. Tumor targeting and imaging using cyclic RGD- PEGylated gold nanoparticle probes with directly conjugated iodine-125 [J]. *Small*, 2011, 7(14): 2052-2060. DOI: 10.1002/sml.201100927.

[15] VACHUTINSKY Y, OBA M, MIYATA K, et al. Antiangiogenic genetherapy of experimental pancreatic tumor by sFlt-1 plasmid DNA carried by RGD-modified crosslinked polyplex micelles [J]. *J Control Release*, 2010, 149(1): 51-57. DOI: 10.1016/j.jconrel.2010.02.002.

[16] SENGUPTA S, ULASOV I V, THACI B, et al. Enhanced transduction and replication of RGD-fiber modified adenovirus in primary T cells [J/OL]. *PLoS ONE*, 2011, 6(3): e18091 [2015-11-20]. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0018091>. DOI: 10.1371/journal.pone.0018091.

[17] GRILL J, GEOERGER B, MORIZET J, et al. Expression of P53, or targeting towards EGFR, enhances the oncolytic potency of conditionally replicative adenovirus against neuroblastoma [J]. *J Gene Med*, 2005, 7(5): 584-594. DOI: 10.1002/jgm.703.

[18] WU J, ZHU Y, XU C, et al. Adenovirus-mediated P53 and ING4 gene co-transfer elicits synergistic antitumor effects through enhancement of P53 acetylation in breast cancer [J]. *Oncol Rep*, 2016, 35(1): 243-252. DOI: 10.3892/or.2015.4385.

[19] DAVIS N M, SOKOLOSZY M, STADELMAN K, et al. Deregulation of the EGFR/P13K/PTEN/Akt/mTORC1 pathway in breast cancer: possibilities for therapeutic intervention [J]. *Oncotarget*, 2014, 5(13): 4603-4650. DOI: 10.18632/oncotarget.2209.

[20] NAKANISHI A, KITAGISHI Y, OGURA Y, et al. The tumor suppressor PTEN interacts with p53 in hereditary cancer (Review) [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44(6): 1813-1819. DOI: 10.3892/ijo.2014.2377.

[21] HOPKINS B D, HODAKOSKI C, BARROWS D, et al. PTEN function: the long and the short of it [J]. *Trends Biochem Sci*, 2014, 39(4): 183-190. DOI: 10.1016/j.tibs.2014.02.006.

[22] XU W T, YANG Z, LU N H, et al. Roles of PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) in gastric cancer development and progression [J]. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014, 15(1): 17-24. DOI: 10.7314/apjcp.2014.15.1.17.

[23] Li M, Zhu Y, Zhang H, et al. Delivery of inhibitor of growth 4 (ING4) gene significantly inhibits proliferation and invasion and promotes apoptosis of human osteosarcoma cells [J]. *Sci Rep*, 2014, 9(4): 7380. DOI:10.1038/srep07380.

[收稿日期] 2015 - 12 - 03 [修回日期] 2016 - 02 - 24
[本文编辑] 党瑞山

本期广告目录

沈阳三生制药有限责任公司 封二
 德国美天旎生物技术有限公司 封三
 索尼(中国)有限公司生命科学业务部 封四
 上海细胞治疗工程技术研究中心集团 后插页